

INHIBIDORES DE LA GERMINACION EN ENDOSPERMA  
DE *RETANILLA EPHEDRA*  
(VENT.) BROGN. RHAMNACEAE

GERMINATION INHIBITORS IN THE ENDOSPERM  
OF *RETANILLA EPHEDRA*  
(VENT.) BROGN. RHAMNACEAE

Mancinelli, S.P.\* , Longeri, S.L.\*\* y Abarzúa, R.M.\*

RESUMEN

Las semillas de *Retanilla ephedra* no germinan en ensayos de laboratorio. La eliminación del endosperma permite la germinación de los embriones sin dificultad. Bioensayos de extractos metanólicos del endosperma, con semillas de lechuga cv. "Great Lakes", muestran un fuerte efecto inhibitor de la germinación en la fase acuosa. Esta inhibe también la germinación de embriones de *Retanilla ephedra*. Bioensayos de cromatogramas del acuoso indican semejanza del efecto inhibitor con el producido por ácido abscísico.

ABSTRACT

Seeds of *Retanilla ephedra* failed to germinate under laboratory conditions. Removal of the endosperm allowed germination of the embryos. Bioassays using a methanolic extract of endosperm inhibited germination of lettuce seeds cv. "Great Lakes". The same extract inhibited germination of isolated embryos of *Retanilla ephedra*.

Bioassays of water extract of the chromatograms revealed that the inhibitory factor may resemble the inhibitory effect of Abscisic Acid.

KEYWORDS: *Retanilla ephedra*. Germination inhibitors. Abscisic Acid.

INTRODUCCION

La germinación de las semillas de numerosas especies está controlada por mecanismos internos y externos. Estos aseguran la permanencia en el

tiempo y en el espacio de la especie y de la población (Hess, 1975; Leopold & Kriedeman, 1975). Las plantas y/o sus semillas pueden producir sustancias inhibitoras de la germinación que controlan el evento (Evenari, 1949; Rice, 1974; Mancinelli y Abarzúa, 1976). La acción de estas sustancias se elimina por acción directa o indirecta por factores del medio ambiente. Experimentalmente, se puede lograr por bajas temperaturas (Villiers & Wareing, 1965), fotoperíodos adecuados (Black & Wareing, 1955).

Se han caracterizado numerosos inhibidores de la germinación en frutos y/o semillas, apare-

\*Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción, Casilla 2407, Concepción.

\*\*Departamento de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Concepción, Casilla 537, Chillán.

ciendo el ácido absísico como uno de alta relevancia (Addicott & Lyon, 1969; Wareing & Saunder, 1973).

*Retanilla ephedra* es un arbusto autóctono de Chile fijador de nitrógeno, cuyas semillas no germinan en pruebas de laboratorio, pero sus embriones aislados lo hacen rápidamente y sin dificultad. Este comportamiento hace suponer la acción de inhibidores. La caracterización de este efecto es el objetivo de este trabajo.

### MATERIALES Y METODOS

Se recolectó frutos de *Retanilla ephedra* en Quebrada Honda, camino Concepción a Tomé, Km. 22, VIII Región, Chile.

Se aisló el endosperma de las semillas por medio de un bisturí, cortándolos finamente. Se pesó 1.646 mg y se extrajo en un soxhlet con metanol al 80% durante 48 hrs. Se eliminó el solvente a presión reducida y baja temperatura. El residuo se disolvió en NaHCO<sub>3</sub> 0.5 N y luego se procedió a separar en fracciones: básica (pH 8,6), ácida (pH 2,5) y neutra (pH 7). Se utilizó un potenciómetro Corning modelo 125, ajustando el pH con HCL 0.5 N y NaHCO<sub>3</sub> 0.5 N (Larsen, 1955). Cada fracción se extrajo tres veces con éter etílico usando volúmenes de 5 ml.

Los extractos etéreos se guardaron en frascos de vidrio con tapa esmerilada y se mantuvieron a baja temperatura para evitar su alteración (4°C). El residuo acuoso de la fracción neutra se guardó en igual forma y se la denominó fracción acuosa (pH 7). Se calculó la concentración de cada fracción evaporando un volumen adecuado (1-4 ml) y pesando el residuo.

Las fracciones se separaron por cromatografía ascendente en bandas de papel Whatmann

Nº 1 de 10 cm de ancho, sembrándose 5 mg de extracto a 7 cm de la parte inferior y se desarrollaron hasta  $\pm$  30 cm en isopropanol: amoníaco: agua (100:14:6) V/V (Hemberg, 1958). Los cromatogramas se secaron a temperatura ambiente y se guardaron a baja temperatura (0-4°C) hasta su análisis posterior. Se desarrollaron tres o más cromatogramas de cada fracción.

Se analizó el efecto de las fracciones básica, ácida, neutra y acuosa sobre la germinación, colocando 25 semillas de lechuga cultivar "Great Lakes" en placas Petri (50 mm  $\psi$ ), con 5 mg más de extracto en 0.7 ml de agua destilada, a menos que se indique lo contrario. Se incubaron a la obscuridad a  $\pm$  23°C y se controló a las 24 hrs.

Para analizar los cromatogramas de cada fracción, éstos se dividieron en 10 partes iguales (origen/frente), originando igual número de Rf, los que se cortaron y se pusieron en sendas placas Petri (50 mm  $\psi$ ), con 25 semillas de lechuga más 0.7 ml de agua destilada. Se usó como control la parte inicial inferior de la banda de papel. De cada cromatograma se hicieron tres bioensayos. Se incubaron y controlaron en la forma ya descrita y los resultados se analizaron por X<sup>2</sup> (Chi<sup>2</sup>) (Wolff, 1968). Los valores que aparecen en tablas y figuras son estadísticamente significativos.

### RESULTADOS

Los análisis preliminares de las fracciones ácida, básica, neutra y acuosa, separadas del extracto metanólico del endosperma de *Retanilla ephedra*, por medio de bioensayos de germinación de semillas de lechuga cv. "Great Lakes", mostraron que la fracción acuosa ejerce un fuerte efecto inhibitorio sobre la germinación, efecto que es significativo (P<0.1%). Como se puede apreciar en la Tabla I.

TABLE I. Efecto de las fracciones ácida, básica, neutra y acuosa extraídas del endosperma de *Retanilla ephedra*, sobre la germinación de semillas de lechuga cv. "Great Lakes". La concentración de cada fracción es de 25 mg 0.7 ml<sup>-1</sup>. Se incubó a la obscuridad a 23°C y se controló a las 24 hrs.

GERMINACION				
	Control	ácida	básica	neutra
+ *	16	11	18	0
-	9	14	7	25
Total	25	25	25	25
Germinación %	100	69	125	0

\* + semillas germinadas; - semillas no germinadas

El análisis por medio de ensayos de germinación de la fracción acuosa del endosperma de *Retanilla ephedra*, usando concentraciones de 0.1 - 0.6 mg·ml<sup>-1</sup>, señala que a concentraciones más bajas que la empleada en los ensayos anteriores

(5 mg), aún se mantiene la inhibición sobre la germinación de semillas de lechuga cv. "Great Lakes", efecto que es significativo ( $P < 0.1\%$ ) y que se observa en la Tabla II.

TABLA II. Efecto de la concentración del extracto acuoso de endosperma de *Retanilla ephedra*, sobre la germinación de semillas de lechuga cv. "Great Lakes". La concentración está expresada en mg. 0.7 ml<sup>-1</sup> de agua destilada. Se incubó a la oscuridad a  $\pm 23^{\circ}\text{C}$  y se controló a las 24 hrs.

GERMINACION						
	Control	0.1 mg	0.2 mg	0.4 mg	0.6 mg	
+	13	12	9	0	0	
-	12	13	16	25	25	
Total	25	25	25	25	25	
Germinación %	100	92	69	0	0	

\* + semillas germinadas; — semillas no germinadas

Los bioensayos del extracto acuoso y endosperma (25 mg respectivamente) sobre embriones de *Retanilla ephedra* (Embrión + cotiledones) con semillas de lechuga en la misma placa Petri,

señalaron una inhibición fuerte en las últimas y en menor grado frente a los embriones de *Retanilla ephedra* (Tabla III).

TABLA III. Efecto del extracto acuoso de endosperma de *Retanilla ephedra* sobre la germinación de sus embriones y de semillas de *Lactuca sativa* L. cv Great Lakes. Incubadas a la oscuridad a  $\pm 23^{\circ}\text{C}$ , control 24 hrs.

		Control	Endosperma*	E. acuoso*
<i>L. sativa</i>	Germinadas	25	19	0
	No germinadas	0	6	25
<i>R. ephedra</i>	Germinadas	10	9	3
	No germinadas	0	1	7

\*25 mg 0.7 ml de agua

Bioensayos con una concentración de extracto acuoso con igual relación peso semilla lechuga/extracto (25 mg vs. 33.5 y 67 mg respectiva-

mente), los embriones de *Retanilla ephedra* no germinaron (Tabla IV).

TABLA IV. Efecto del extracto acuoso de endosperma de *Retanilla ephedra* sobre la germinación de sus embriones. Las concentraciones corresponden a 33.5 y 67 mg · 0.7 ml de agua, incubadas a la oscuridad. Control a las 24 hrs.

Concentración (mg)			
	Control	33.5	67
Germinadas	10	0	0
No germinadas	0	10	10

Los bioensayos de germinación de cada uno de los rf de cromatogramas de las fracciones ácida, básica, neutra y acuosa, con semillas de lechuga cv. "Great Lakes", señalaron un efecto inhibitorio de todas las fracciones, pero en la parte acuosa el efecto es estadísticamente significati-

vo ( $P < 0.1\%$ ). La comparación entre los cromatogramas de la fase acuosa con el de ácido abscísico muestran coincidencia de rf del efecto inhibitorio de la germinación, como se puede observar en la Fig. 1D y 1E

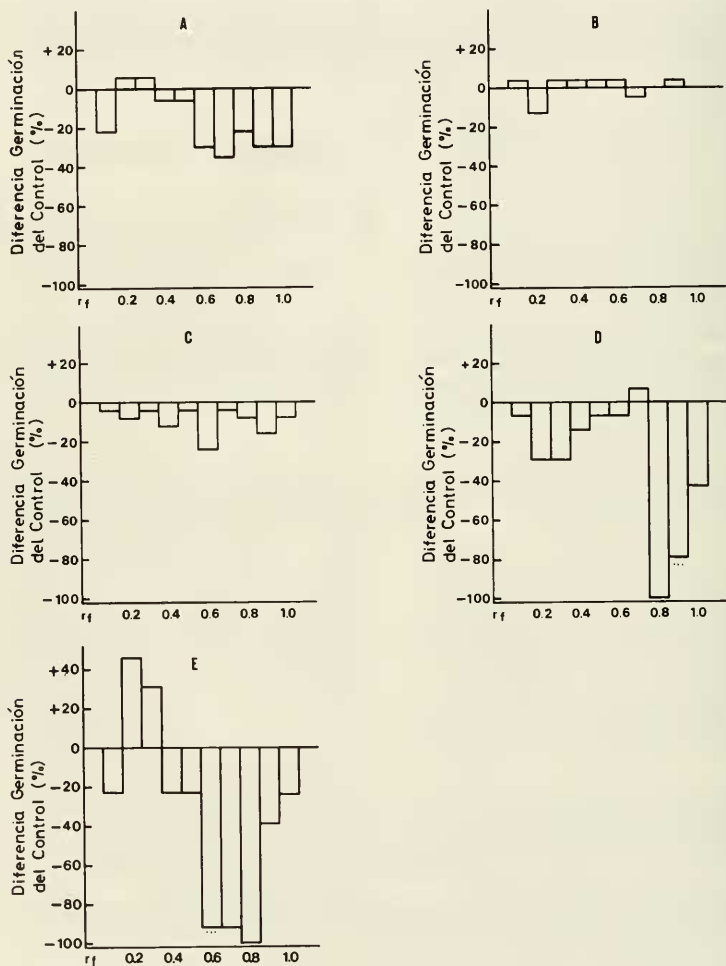


FIGURA 1. Histogramas de bioensayos de germinación de semillas de lechuga cv. "Great Lakes" de las fracciones básicas (A), ácida (B), neutra (C), acuosa (D) y ácido abscísico (E). Se sembró 5 mg de extracto por banda, se incubó a 23 °C y se controló a las 24 hrs. (... =  $P < 0.1\%$ ).

## DISCUSION

La cubierta seminal de muchas especies restringe la germinación impidiendo la entrada del agua o del oxígeno, esto último es más importante que la salida del CO<sub>2</sub> producido metabólicamente, puesto que su solubilidad en agua baja su operatividad (Heydecker & Orphanos, 1980). La escarificación o eliminación de la testa de las semillas de *Retanilla ephedra* no elimina la restricción germinativa, por lo tanto, no se puede argumentar que la falta de germinación sea debida a un efecto mecánico o de impermeabilidad de la testa (Chen & Thimann, 1966). Al comprobar que los embriones aislados germinan sin ninguna dificultad, entonces la restricción germinativa debe encontrarse en los tejidos que rodean al embrión (endosperma).

El análisis preliminar del efecto sobre la germinación de las fracciones permitió caracterizar el comportamiento general de éstas (Webb *et al.*, 1973), destacándose el fuerte efecto inhibitorio de la fracción acuosa sobre la germinación (Tabla I).

Como la cantidad de extracto de la fracción colocada en las placas es de  $\pm 5$  mg, el efecto inhibitorio podría atribuirse a la concentración. Por lo tanto, se diluyó el extracto acuoso de 0.1 a 0.6 mg · 0.7 ml<sup>-1</sup>. Los bioensayos (Tabla II) muestran que el efecto inhibitorio sobre la germinación se debe a la naturaleza de éste y no a su concentración y los resultados son estadísticamente significativos (P < 0.1%). Sin embargo, al considerar que se usó NaHCO<sub>3</sub> y HCl para ajustar el pH, la presencia de NaCl resultante podría también estar implicado por cambios en el potencial hídrico ( $\psi$ ). Sin embargo, bioensayos con NaHCO<sub>3</sub> en las mismas condiciones utilizadas para obtener la fracción acuosa demostraron no ser efectivas, puesto que no se produjo inhibición de la germinación (resultados no mostrados). Por lo tanto, esto apoya la presencia de un factor inhibitorio en la fracción acuosa extraída del endosperma de *Retanilla ephedra*. Existe la posibilidad que las semillas de lechuga cultivar "Great Lakes" sean fotoblásticas, lo que podría influir en los resultados, pero como todos los bioensayos se hicieron a la obscuridad y a la misma temperatura, 23°C, no se podría argumentar otra influencia que no sea el factor inhibitorio presente en la fracción acuosa.

La incubación de embriones de *Retanilla*

*ephedra*, junto a semillas de lechuga con extracto acuoso y endosperma en la misma placa, mostraron nuevamente el fuerte efecto inhibidor de la germinación sobre las semillas de lechuga aunque en menor grado en los embriones de *Retanilla ephedra* (Tabla III), siendo más acentuado el efecto del extracto acuoso.

Considerando el aparentemente menor efecto sobre los embriones de *Retanilla ephedra*, se estimó que debería mantenerse con éstos la misma relación utilizada peso extracto/peso semilla de lechuga en los bioensayos anteriores. De esta manera se trató de equiparar los ensayos de germinación, detectándose ahora una inhibición total de la germinación de los embriones de *Retanilla ephedra* (Tabla IV), con las dos concentraciones de extracto acuoso ensayadas (33.5 y 67 mg). Estas experiencias apoyan la hipótesis que el inhibidor de la germinación en *Retanilla ephedra* está presente en el endosperma y que la aparente falta de actividad se debía al uso de dosis subvaloradas pero adecuadas para los bioensayos con semillas de lechugas.

El análisis de la fracción acuosa separando por cromatografía y el consiguiente bioensayo de cada rf, señaló que la zona de rf 0.8 - 0.9 presentaba un fuerte inhibidor sobre la germinación. Esta actividad coincide con la del ácido abscísico desarrollado en forma separada o como co-cromatografía (Fig. 1E), esto hace suponer que una parte del efecto inhibitorio es semejante a la del ácido abscísico, puesto que la zona restrictiva en el cromatograma de la fracción acuosa es más extensa (Fig. 1E). Aunque Webb *et al.*, 1973, señalan que ABA se encuentra en la fracción ácida y entre rf 0.6-0.8 (Wareing & Saunder, 1971), su sistema de solventes para desarrollar los cromatogramas isopropanol: amoniaco: agua (10:1:1) es más polar que el utilizado en el presente trabajo (10:1:4:0:6), por lo tanto, su posición en el cromatograma es distinta (Becerra, J. Comunicación Personal). Además, la fracción ácida fue la que menos actividad presentó en los bioensayos. Esto permite apoyar la similitud del efecto inhibidor del endosperma de las semillas de *Retanilla ephedra*, con el de ABA. Por otra parte, bioensayos con ácido sináptico, ácido siríngico, ácido transcinámico, cumarina, ácido ferúlico y ácido cafeico (resultados no mostrados), no pudieron homologarse con el efecto inhibitorio presente en las semillas de *Retanilla ephedra*. A pesar que los dos primeros producen inhibición total de la ger-

minación en los bioensayos, no fue posible identificarlos cromatográficamente.

## BIBLIOGRAFIA

- ADDICOT, F.T. & LYON, J.L. 1969. Physiology of Abscisic Acid and Related Substances. *Annual Rev. Pl. Physiol.* 20: 139-164.
- BLACK, M. & WAREING, P.F. 1955. Photoperiodic Control of Germination of Seed of Birch (*Betula pubescens* Ehrh.). *Nature*, 164: 705.
- CHEN, S.S. & THIMANN, K.V. 1966. Nature of Seed Dormancy in *Phacelia tanacetifolia*. *Science*, 153: 1537-1539.
- EVENARI, M. 1949. Germination Inhibitors. *Bot. Rev. (Lancaster)* 15: 153-194.
- HEMBERG, T. 1958. Auxins and Growth-inhibiting Substances in Maize Kernels. *Physiol. Plant. (Copenhagen)* 11: 284-311.
- HESS, D. 1975. *Plant Physiology*. New York, Springer-Verlag. 333 pp.
- HEYDECKER, W. & ORPHANOS, P.I. 1980. In: Khan, A.A. (ed.). *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*. Amsterdam, North-Holland Biomedical Press. 267-382.
- LARSEN, P. 1955. Growth Substances in Higher Plant. In: Paech, K. & Tracey, M.V. (eds.). *Modern Methods of Plant Analysis*. Berlin, Springer-Verlag. 565-625.
- LEOPOLD, A.C. & KRIEDEMANN, P.E. 1975. *Plant Growth and Development*. New York, McGraw-Hill, Inc. 545 pp.
- LUCKWILL, L.C. 1980. In: Khan, A.A. (ed.). *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*. Amsterdam, North-Holland Biomedical Press. 29-50.
- MANCINELLI, S.P. & ABARZUA, R.M. 1976. Inhibidores en *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae). (Alelopatía). *Bol. Soc. Biol. Concepción*. 51: 129-135.
- RICE, E.L. 1974. *Allelopathy*. New York, Academic Press. 353 pp.
- VILLIERS, T.A. & WAREING, P.F. 1965. The Growth Substances of Dormant Fruits of *Fraxinus*. *J. Exp. Bot.* 16: 534-544.
- WAREING, P.F. & SAUNDER, P.F. 1971. Hormones and Dormancy. *Annual Rev. Pl. Physiol.* 22: 261-288.
- WEBB, D.P., VAN STANDEN, J. & WAREING, P.F. 1973. Seed Dormancy in *Acer*. *J. Exp. Bot.* 24: 741-750.
- WOOLF, C.M. 1968. *Principles of Biometry*. New York, Van Nostrand Co. 359 pp.